

# 蜕皮激素诱导下家蚕 CYP3 基因家族的表达变化

高瑞娜<sup>1</sup>, 卫正国<sup>1,2</sup>, 张 婷<sup>1</sup>, 王瑞娴<sup>1</sup>, 赵国栋<sup>1</sup>, 李 兵<sup>1,2</sup>, 沈卫德<sup>1,2,\*</sup>

(1. 现代丝绸国家工程实验室, 江苏苏州 215123; 2. 苏州大学蚕桑研究所, 江苏苏州 215123)

**摘要:** 为了研究家蚕 *Bombyx mori* CYP3 家族基因经蜕皮激素诱导后的表达变化, 用蜕皮激素溶液 ( $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 浸泡的桑叶喂食家蚕 *B. mori* 5 龄幼虫, 以不用蜕皮激素处理的桑叶喂食家蚕为对照, 采用双跟踪标定定量 PCR (dual-spike-in qPCR) 方法, 检测在蜕皮激素诱导下家蚕中肠和脂肪体内 CYP3 基因家族的转录水平。结果表明: 与对照相比, 在蜕皮激素诱导下家蚕幼虫体内脂肪体中 *CYP302*, *CYP306* 和 *CYP339* 的转录水平分别上升了 191.4, 7.4 和 421 倍, 在中肠中变化不显著; 其余基因转录水平变化不明显或检测不到转录活性。结果说明 *CYP339* 基因有可能参与家蚕蜕皮激素的代谢, 这为进一步研究 P450 基因与内源物质的关系提供理论基础。

**关键词:** 家蚕; CYP3 家族; 蜕皮激素; 双跟踪标定定量 PCR; 转录水平

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)09-0944-06

## Changes in the expression of the CYP3 family genes under the induction of ecdysone in *Bombyx mori*

GAO Rui-Na<sup>1</sup>, WEI Zheng-Guo<sup>1,2</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, WANG Rui-Xian<sup>1</sup>, ZHAO Guo-Dong<sup>1</sup>, LI Bing<sup>1,2</sup>, SHEN Wei-De<sup>1,2,\*</sup> (1. National Engineering Laboratory for Modern Silk, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. Institute of Sericulture, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

**Abstract:** To study the change in expression of the CYP3 family genes induced by ecdysone, we measured their transcription level by dual spike-in qPCR in the midgut and fat body of *Bombyx mori* 5th instar larvae fed on mulberry leaves soaked in ecdysone solution ( $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) with those fed on mulberry leaves not soaked in ecdysone solution as the control. The results showed that compared with the control, the transcription level of *CYP302*, *CYP306* and *CYP339* increased by 191.4, 7.4 and 421 times in fat body, respectively, and that of the other genes induced by ecdysone did not change significantly or was not detectable. These results suggest that *CYP339* gene may be involved in the metabolism of silkworm ecdysone. This work laid a theoretical foundation for further study on the relationship between P450 genes and the metabolism of endogenous substances.

**Key words:** *Bombyx mori*; CYP3 family; ecdysone; dual spike-in qPCR; transcription level

昆虫的蜕皮激素属于类固醇激素, 类固醇类激素对高等有机体的再生、发育和内环境稳定等多方面都有调节作用 (Manglesdorf *et al.*, 1995)。在节肢动物中, 特别是在发育阶段的转变期, 类固醇类激素起着重要的发育调节作用。蜕皮酮 (E) 对双翅目昆虫多线染色体影响的研究第一次证明了类固醇激素在转录水平起作用 (Henrich *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2002)。Hansen 等 (2008) 以雄性和雌性成虫和第 5 龄期的飞马哲水蚤 *Calanus finmarchicus* 幼虫为实验材料分析可能参与蜕皮激素调节的 3 个相关基因: *CYP301A1*, *CYP305A1* 和 *CYP330A1*。其中

*CYP301A1* 在雄性和产卵后的雌性中高表达, 可能参与蜕皮激素的降解 (Hansen *et al.*, 2008)。关于昆虫 CYP3 基因家族功能方面的研究主要集中在 *CYP301A1*, *CYP302A1*, *CYP303A1*, *CYP305A1*, *CYP306A1*, *CYP307A1*, *CYP312A1*, *CYP314A1*, *CYP315A1* 和 *CYP330A1* 等方面 (路爱成等, 2009)。

目前, 家蚕 *Bombyx mori* CYP3 基因家族中研究较多的是与蜕皮激素合成相关的基因, 它们分别参与了家蚕蜕皮激素合成的不同步骤。Niwa 等 (2004) 利用荧光差异显示技术分别克隆到家蚕 *CYP302A1*, *CYP306A* 和 *CYP315A1*, 再将其转入果

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设项目 (nycytx-27-gw307)

作者简介: 高瑞娜, 女, 1985 年生, 山西运城人, 硕士, 主要从事昆虫分子生物学研究, E-mail: gaoruina2008@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shenwd@suda.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-03-06; 接受日期 Accepted: 2010-07-08

蝇的 S2 细胞,用各种蜕皮激素有关的物质作底物进行诱导,结果表明, *CYP302A1* 能将 2, 22-二脱氧蜕皮酮转化成 2-脱氧蜕皮酮; *CYP306A1* 能将 2, 22,25-三脱氧蜕皮酮转化成 2,22-二脱氧蜕皮酮。Namiki 等(2005)克隆了另外一个 Halloween 家族基因 *CYP307A1*,其表达与家蚕血液中蜕皮激素的浓度有相当高的一致性。Rewitz 等(2006)发现使  $\alpha 2$  蜕皮酮转化成  $\beta 2$  蜕皮酮的 P450 酶是蜕皮酮 20-单加氧酶 *CYP314A1*。昆虫细胞色素 P450 基因不仅参与了蜕皮激素的合成,而且还参与了蜕皮激素的代谢(Nebert and Gonzalez, 1987)。已有研究推断蜕皮激素是家蚕 *CYP18A1* 的调控因子, *CYP18A1* 是作为编码 C26 羟基化酶的候选 P450 基因(艾均文等, 2008),但是在家蚕 CYP3 基因家族成员中还没有报道与蜕皮激素代谢有关的基因。

由于传统定量方法是终点检测,无法直接从终点产物量推算出起始模板量。加入内标后,可部分消除终产物定量所造成的不准确性,但只能算作半定量、粗略定量的方法。在实时荧光定量方法中加入内标,但由于内标没有统一的标准,在不同的物种和组织中表达量不稳定,所以用内标法也不可靠。综上所述,利用外标准曲线的实时荧光定量 PCR 是迄今为止定量最准确、重现性最好的定量方法,已得到全世界的公认,广泛用于基因表达研究、转基因研究、药物疗效考核、病原体检测等诸多领域。

本研究通过双跟踪标定定量 PCR(dual spike-in qPCR)方法,测定了在正常饲养下和在蜕皮激素诱导下 CYP3 基因家族成员的转录水平,通过比较转录水平的变化趋势,研究 P450 基因与蜕皮激素之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料:**以本研究室保存的家蚕大造品种为实验材料,饲养条件:  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , RH 60% ~ 75%,桑叶育。从 5 龄第 2 天开始,用蜕皮激素溶液( $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ )(路爱成, 2009)浸泡桑叶,喂食家蚕 2 h 后换用正常桑叶。每 10 头蚕为一个样本,取喂食后 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h 家蚕 5 龄幼虫各样本的中肠和脂肪体;另设不用蜕皮激素处理的为对照组。用 PBS 冲洗后贮存在  $-70^\circ\text{C}$  备用。

**1.1.2 试剂和药品:**蜕皮激素溶液(20-羟基蜕皮甾酮,  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$ )由江苏牧王药业有限公司提供; TRNzol Total RNA Reagent 由天根科技有限公司提供; DNase I、M-MLV 反转录酶、RNase Inhibitor、SYBR Premix Ex Taq™ 等由 TaKaRa 公司提供;引物、异丙醇(isopropanol)和 DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  由上海生物工程技术有限公司提供;三氯甲烷(trichlorome-thane)由南京化学试剂有限公司提供。

### 1.2 核酸的提取

**1.2.1 外源参照基因:**外源参照基因 *IFP2* 由中国科学院上海生化细胞所陆长德组提供。外源参照基因的 DNA 是含 *IFP2* 基因片段的线性化质粒 pPigT7 (4 983 bp), mRNA 是将线性化质粒 pPigT7 进行体外转录,纯化并定量后的 *IFP2* mRNA;二者按质量比 1  $\mu\text{g}$ : 1  $\mu\text{g}$  配成 RNA/DNA 混合液, mRNA/DNA 拷贝数比为 4.09:1。

**1.2.2 总 RNA 的提取:**在冰上解剖各样本的组织器官,取约 100 mg 组织加 1 mL TRNzol 液在液氮中研磨成粉末;加入外源参照基因 RNA/DNA 混合物 5  $\mu\text{L}$ ,继续研磨,在室温放置 5 min; 12 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 15 min;上清液按每毫升 TRNzol 液加入 0.2 mL 氯仿,剧烈震荡,室温放置 2 ~ 3 min, 12 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 15 min;这时离心管内液体分成 3 层,上层为含 RNA 的水相,中间为 DNA,下层为含蛋白质的有机相;取上清液,并保留离心管内残液以备提取 DNA;按每毫升 TRNzol 液加入 0.5 mL 异丙醇,颠倒混匀,室温放置 10 min, 12 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min,弃上清液;按每毫升 TRNzol 液加入 1 mL 75% DEPC 乙醇,颠倒混匀,5 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 5 min,弃上清液;室温干燥,看到白色沉淀变成半透明后加入 20 mL DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  溶解,用 DNase I 处理,保存在  $-70^\circ\text{C}$  中,用作定量 PCR 的模板。

**1.2.3 DNA 的提取:**取上述离心管内残液,加入 0.3 mL 100% 乙醇,混匀,放置 2 ~ 4 min; 6 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 5 min;除去酚-乙醇上清,沉淀即为 DNA;加入 1 mL 0.1 mol/L 柠檬酸配制的 10% 乙醇,放置 30 min; 6 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 5 min; 1 mL 0.1 mol/L 柠檬酸配制的 10% 乙醇再洗一次;加入 1 mL 75% 乙醇,放置 10 ~ 20 min; 6 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 5 min;室温干燥后,加入 TE 溶解; 12 000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min 以除去不溶解的胶状物,保存在  $-20^\circ\text{C}$  中,用作定量 PCR 的模板。

1.3 cDNA 第一链的合成

50 μL 反应体系包括：总 RNA 1 μg, 50 μmol/L Oligo(dT)<sub>16</sub> 引物 1 μL, 5 × M-MLV buffer 10 μL, 10 mmol/L dNTP 2.5 μL, 40 U/μL RNase Inhibitor 0.5 μL, 200 U/μL M-MLV 反转录酶 1 μL; 于 42℃

反应 1 h。

1.4 引物的设计与合成

实验所用的引物均使用 Primer 5.0 软件设计, 引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物  
Table 1 Primer pairs for Real-time PCR

目的基因 Target gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	引物 T <sub>m</sub> 值(℃) T <sub>m</sub> of primer	产物长度(bp) Length of product	产物 T <sub>m</sub> 值(℃) T <sub>m</sub> of product
CYP302	F: TTGAATTGGCGACGTTATGG	59.40	114	83.1
	R: TGGATAGCGGTGCTCTTGTC	58.10		
CYP305	F: TGGCAGCAGCTCAATTGTTTC	57.80	137	80.0
	R: CGTAGACGACGACCACTAATTC	60.07		
CYP306	F: TGCCTTGGACCTTCCTCAT	57.40	154	83.7
	R: AACACCTGCGACTCCCATCT	59.20		
CYP307	F: TCTGAAGCCGATACTGATGAAG	57.30	147	85.4
	R: ACAGCGTAGCCCTGGTTGAT	59.50		
CYP314	F: TTTCTCGAACGATGGATGTC	57.80	148	86.6
	R: CCTCGCTTTTAAACGAATGTC	57.80		
CYP315	F: TCAGCGACCCAACTCACAT	56.40	135	81.0
	R: CTCCTGCCATAAAGAAAAGTCC	57.70		
CYP332	F: GTATCGGTTGTGAAATGGG	57.80	136	84.8
	R: 5'-CTACGAACTAAGCAAGAGGCA	55.02		
CYP337	F: AAGTCGCAAGCTGCTGAAGG	60.60	158	85.3
	R: AAGCGGTGTTGGCTGGTGAT	62.60		
CYP339	F: TACGGTCCTGTGCTACGCTT	55.90	108	83.7
	R: GACAGGGCAATCACCTTCTAT	58.00		
CYP366	F: AGACAGCCTTCGGTTTTCC	56.60	118	85.3
	R: AGATGCAGCAGAGGGTTGAG	57.50		
IFP2	F: CTGTGCACGGTAGTTGTC	57.30	144	80.0
	R: TCAGTACTTCCGTATCTCG	57.80		

1.5 Real-time PCR

Real-time PCR 反应采用荧光染料 SYBR Green I 在 ABI Prism 7300 上进行。

PCR 反应体系：SYBR Premix Ex Taq (2 ×) 10 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 0.4 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 0.4 μL, ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL, 模板 2.0 μL, dH<sub>2</sub>O 6.8 μL, 总体积 20 μL。

PCR 程序：两步法 PCR 扩增, 50℃ 2 min;

95℃ 预变性 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 31 s, 45 个循环; Dissociation Stage。每个样品重复测定 3 次。

1.6 标准曲线制作

将 Hind III 处理的线性化模板 pPigT7 稀释成不同的浓度梯度, 利用 real-time PCR 测定 IFP2 的 Ct 值, 制作成标准曲线。由于下列计算中涉及所测基因的不同  $\alpha$  值 (标准曲线的斜率, 表 2), 需按同样的方法制作各基因的标准曲线。

表 2 各基因标准曲线的斜率  
Table 2 The slope (*a* value) of the standard curve for each gene

目的基因 Target gene	<i>IFP2</i>	<i>CYP302</i>	<i>CYP305</i>	<i>CYP306</i>	<i>CYP307</i>	<i>CYP314</i>	<i>CYP315</i>	<i>CYP332</i>	<i>CYP337</i>	<i>CYP339</i>	<i>CYP366</i>
<i>a</i> value	-3.6882	-3.7830	-3.2822	-3.3100	-3.4001	-3.2330	-3.8500	-4.0250	-3.5302	-3.3525	-3.4861

1.7 数据统计与分析

所测数据根据 Zhang 等(2009)方法进行计算, 计算所得值表示某基因转录的 mRNA 拷贝数, 代表基因的转录水平。数值表示为平均数 ± 标准差; 用 *t* 检验对基因对照组和处理组之间差异显著性进行分析。

2 结果与分析

2.1 蜕皮激素诱导后 CYP3 基因家族成员在中肠中的转录水平

表 3 数据是经蜕皮激素溶液诱导家蚕后 CYP3 基因家族成员在中肠的转录水平。数据表明, 在蜕皮激素诱导下, 大多数 CYP3 家族基因的转录水平比较低, 值都在 1 以下, 几乎检测不到; 其中 *CYP306*,

*CYP332* 和 *CYP339* 的 mRNA 拷贝数略高, 但转录水平变化不显著。

2.2 蜕皮激素诱导后 CYP3 基因家族在脂肪体中的转录水平

表 4 数据是家蚕添食蜕皮激素后, 在一段时间内脂肪体中 CYP3 基因家族的转录水平。从表中可以看出, 在蜕皮激素诱导下, *CYP305*, *CYP307*, *CYP315*, *CYP337* 和 *CYP366* 的转录水平比较低, 几乎检测不到转录活性; *CYP314* 的转录水平不高且没有显著变化; *CYP306* 的转录水平在诱导 4 h 达到最大, mRNA/DNA 拷贝数比为 4.81; *CYP302* 和 *CYP339* 的转录水平都在诱导 2 h 达到最大, mRNA/DNA 拷贝数比分别为 15.31 和 153.86。

表 3 CYP3 基因家族各基因经蜕皮激素 ( $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 诱导后在家蚕中肠中的转录水平

Table 3 The transcription level of CYP3 family genes after induction by ecdysone ( $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) in the midgut of *Bombyx mori*

诱导时 间(h) Induction time	<i>CYP302</i>	<i>CYP305</i>	<i>CYP306</i>	<i>CYP307</i>	<i>CYP314</i>	<i>CYP315</i>	<i>CYP332</i>	<i>CYP337</i>	<i>CYP339</i>	<i>CYP366</i>
2	—	—	0.0197 ± 0.0059	—	0.0200 ± 0.0018	0.0205 ± 0.0018	0.1115 ± 0.0217	—	0.0637 ± 0.0358	—
4	0.0636 ± 0.0101	—	0.0119 ± 0.0022	—	—	—	0.0389 ± 0.0005	—	0.0461 ± 0.0011	0.0741 ± 0.0013
8	—	—	0.0009 ± 0.0001	—	—	—	0.0252 ± 0.0033	—	0.2099 ± 0.0021	—
12	—	—	—	—	0.0006 ± 0.0001	0.0006 ± 0.0001	0.0062 ± 0.0000	—	0.0265 ± 0.0024	—
24	0.0052 ± 0.0027	—	—	—	—	—	0.0149 ± 0.0011	—	0.0011 ± 0.0004	—
48	—	—	0.0065 ± 0.0006	—	—	—	0.0146 ± 0.0066	—	0.0074 ± 0.0004	—
72	0.3867 ± 0.0944	—	—	—	0.0576 ± 0.0088	—	2.8669 ± 0.6556	—	0.0481 ± 0.0118	—

“—”: 未检测到 Not detectable. 下同 The same below.

表 4 CYP3 基因家族各基因经蜕皮激素 ( $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 诱导后在家蚕脂肪体中的转录水平

Table 4 The transcription level of CYP3 family genes after induction by ecdysone ( $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) in the fat body of *Bombyx mori*

诱导时 间(h) Induction time	<i>CYP302</i>	<i>CYP305</i>	<i>CYP306</i>	<i>CYP307</i>	<i>CYP314</i>	<i>CYP315</i>	<i>CYP332</i>	<i>CYP337</i>	<i>CYP339</i>	<i>CYP366</i>
2	15.3140 ± 1.5890	—	0.9837 ± 0.0975	—	0.2407 ± 0.1404	—	—	—	153.8600 ± 14.1100	—
4	0.0427 ± 0.0139	—	4.8086 ± 0.7371	—	0.0121 ± 0.0023	—	—	—	2.1615 ± 0.0298	—
8	0.3571 ± 0.0224	—	2.7268 ± 0.0224	—	0.2926 ± 0.2812	—	—	—	—	—
12	0.0131 ± 0.0013	—	3.7418 ± 0.0388	—	0.0019 ± 0.0002	—	—	—	5.6327 ± 2.5290	—
24	0.3637 ± 0.0204	—	0.4157 ± 0.2242	—	0.0998 ± 0.0003	—	—	—	3.7827 ± 0.2753	—
48	—	—	0.3469 ± 0.0614	—	0.0009 ± 0.0000	—	—	—	5.0860 ± 0.0881	—
72	0.0619 ± 0.0297	—	—	0.0045 ± 0.0002	0.0063 ± 0.0016	0.0538 ± 0.0039	—	—	4.0090 ± 0.4784	—

### 2.3 在脂肪体中 CYP3 基因家族部分基因在蜕皮激素诱导下和正常情况下的转录水平比较

根据 Zhang 等(2009)的方法, mRNA / DNA 拷贝数比在 1 以下属于超低转录水平, 可以认为不转录; 5 以下属于低转录水平, 在 5 ~ 50 之间属于中等转录水平, 在 50 ~ 500 之间属于高转录水平。CYP302 在蜕皮激素诱导下的转录水平属于中等水平, 与对照相比诱导上升了 191.4 倍(图 1: A); CYP306 在诱导下的转录水平属于低水平, 和对照组相比上升了 7.4 倍(图 1: B); CYP339 经诱导 2 h 后其转录水平达到了高水平, 且与对照相比转录水平诱导上升了 421 倍(图 1: C), 诱导变化显著。

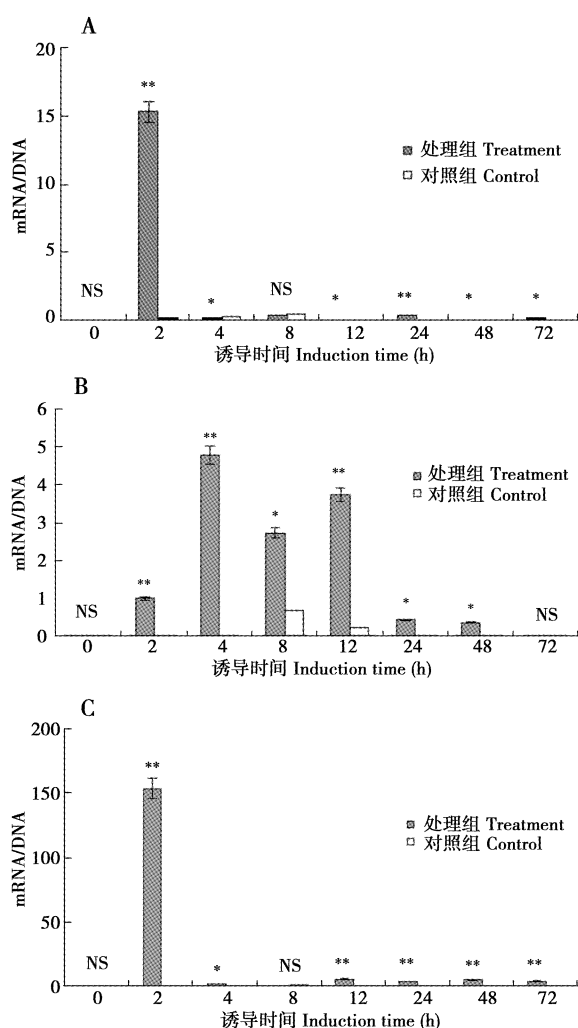


图 1 CYP302 (A), CYP306 (B) 和 CYP339 (C) 基因经蜕皮激素诱导后在家蚕脂肪体中的转录水平

Fig. 1 The transcription level of CYP302 (A), CYP306 (B) and CYP339 (C) after induction by ecdysone in the fat body of *Bombyx mori*. 图中数值为平均数 ± 标准差; 基因对照组和处理组之间的差异显著性进行了比较 (*t* 检验), \*  $0.01 \leq P \leq 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , NS 表示差异不显著。Data in the figure are mean ± SD; the significances of differences between the treatment and control were tested (*t* test), \*  $0.01 \leq P \leq 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , NS indicates no significant difference.

## 3 讨论

P450 基因活性能被天然或合成的化合物所诱导, 诱导作用不仅限于一个组织, 不同组织对诱导剂可能有不同的诱导机制和诱导响应(潘贻武等, 2007)。本研究表明, 在  $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的蜕皮激素溶液诱导下, CYP302, CYP306, CYP314, CYP315 和 CYP339 在中肠和脂肪体中都有表达, 但不同的组织表达差异很大; CYP305 和 CYP337 在中肠和脂肪体中都没有诱导表达; CYP307 在中肠中没有表达, 在脂肪体中有少量表达; CYP337 和 CYP366 在中肠中有比较低的转录, 在脂肪体中没有检测到。表明这几个基因不受蜕皮激素诱导, 同时说明诱导剂的诱导作用存在一定程度的特异性, 对某种或几种 P450 酶有效应的化合物并不一定诱导其他类型的 P450 基因(潘贻武等, 2007)。

CYP305, CYP307, CYP314, CYP315, CYP337 和 CYP366 在蜕皮激素诱导下的转录活性大部分都检测不到, 或者非常低, 没有明显诱导变化, 这表明经过蜕皮激素诱导它们的转录活性有可能被抑制, 也可能是不同的基因对外源物质的敏感度存在差异所导致。本研究与 Maeda 等的研究结果一致, 即 CYP306, CYP307 和 CYP314 分别参与蜕皮激素的合成(Niwa *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2008)。

昆虫细胞色素 P450 基因不仅参与了蜕皮激素的合成, 而且还参与了它的代谢(Nebert and Gonzalez, 1987)。艾均文等(2008)推测 CYP18A1 与家蚕蜕皮激素代谢有一定的关系, 且在信息分析时发现家蚕中还有另外一个 P450 基因和 CYP18A1 的相似性为 39%。说明在家蚕体内除 CYP18A1 外可能还有其他 P450 基因参与蜕皮激素的代谢。

CYP302 基因在蜕皮激素诱导下中肠中的转录水平较低, 诱导 2 h 后脂肪体中的 mRNA 拷贝数上升; CYP306 在诱导 4 h 后脂肪体中的转录水平达到最大; 推测 CYP302 和 CYP306 可能与蜕皮激素的代谢有一定的关系。这与 Niwa 等(2004, 2005)的研究结果不一致, 还需进一步研究证实。

CYP339 基因经蜕皮激素诱导后在中肠和脂肪体中都检测到它的转录活性。在中肠中诱导后的转录水平比较低, 诱导变化不明显; 在脂肪体中诱导 2 h 后的 mRNA/DNA 拷贝数比达到最大, 转录水平最高, 且与对照组相比转录水平上调了 421 倍。P450 酶活性的增加或其表达量的增加可以通过基

因水平、转录水平和翻译水平几个方面实现,其中转录水平主要表现为转录效率增加。许多研究表明 P450 相关的抗性往往表现为某种 P450 的转录效率增加(潘贻武等, 2007)。这说明 *CYP339* 基因在蜕皮激素的诱导下实现了转录效率的增加,可能参与家蚕体内蜕皮激素的代谢。本实验通过实时荧光定量 PCR 的方法检测到 *CYP339* 的转录水平经蜕皮激素诱导后显著上升,但是关于 *CYP339* 基因受蜕皮激素的调控还有待于进一步研究和证实。

在蜕皮激素诱导下, P450 3 (CYP3) 家族基因并不是所有的基因都受其诱导,大部分基因的表达量没有显著变化,只有少数基因(*CYP302*, *CYP306* 和 *CYP339*)诱导后表达量上升,推测这 3 个基因在蜕皮激素的代谢中起一定的作用。

### 参 考 文 献 (References)

- Ai JW, Wang GH, Li YH, Yu QY, Zhang XS, Zhu Y, Xiang ZH, 2008. Molecular cloning, sequence analysis and transcriptional activity determination of cytochrome P450 gene *CYP18A1* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 51(3): 237–245. [艾均文, 王根洪, 李艳红, 余泉友, 张学松, 朱勇, 向仲怀, 2008. 家蚕 P450 基因 *CYP18A1* 的克隆、序列分析及转录活性. 昆虫学报, 51(3): 237–245]
- Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT, 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 883–916.
- Hansen BH, Altin D, Hessen KM, Dahl U, Breitholtz M, Nordtug T, Olsen AJ, 2008. Expression of ecdysteroids and cytochrome P450 enzymes during lipid turnover and reproduction in *Calanus finmarchicus* (Crustacea: Copepoda). *General and Comparative Endocrinology*, 158: 115–121.
- Henrich VC, Rybczynski R, Gilbert LI, 1998. Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development. *Vitamins and Hormones*, 55: 73–125.
- Lu AC, Wei ZG, Li B, Shen WD, 2009. Induced expression of *CYP305B1V1* gene in different tissues of *Bombyx mandarina* Moore. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 37(12): 5400–5402. [路爱成, 卫正国, 李兵, 沈卫德, 2009. 野桑蚕不同组织细胞色素 P450 *CYP305B1V1* 基因的诱导表达特征研究. 安徽农业科学, 37(12): 5400–5402]
- Maeda S, Nakashima A, Yamada R, Hara N, Fujimoto Y, Ito Y, Somobe H, 2008. Molecular cloning of ecdysone 20-hydroxylase and expression pattern of the enzyme during embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149(3): 507–516.
- Manglesdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM, 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835–839.
- Namiki T, Niwa R, Sakudoh T, Shirai K, Takeuchi H, Kataoka H, 2005. Cytochrome P450 *CYP307A1*/Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1): 367–374.
- Nebert DW, Gonzalez FJ, 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 945–993.
- Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2004. *CYP306A1*, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 279(34): 35942–35949.
- Niwa R, Sakudoh T, Namiki T, Saida K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2005. The ecdysteroidogenic P450 *CYP302A1/disembodied* from the silkworm, *Bombyx mori*, is transcriptionally regulated by prothoracicotropic hormone. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 563–571.
- Pan YW, Liu N, Liu XN, 2007. Advances in studies of cytochrome P450 in the insect and its mediated insecticide resistance. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 44(4): 470–475. [潘贻武, 刘宁, 刘小宁, 2007. 昆虫细胞色素 P450 的研究进展及其介导的抗药性. 新疆农业科学, 44(4): 470–475]
- Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006. Developmental expression of *Manduca shade*, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 247: 166–174.
- Zhang Y, Wei ZG, Li YY, Chen YH, Shen WD, Lu CD, 2009. Transcription level of messenger RNA per gene copy determined with dual-spike-in strategy. *Analytical Biochemistry*, 394: 202–208.

(责任编辑: 赵利辉)